

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
17. Januar 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/04620 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/00

SINGER, Thorsten [DE/DE]; Schleifersberg 13,
42697 Solingen (DE). COSAERT, Sarah [DE/DE];
Leopold-Gmelin-Strasse 8, 51061 Köln (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/08066

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. Juli 2001 (12.07.2001)

(74) Anwälte: LEIDESCHER, Thomas usw.; Zimmermann
& Partner, Postfach 330 920, 80069 München (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
100 33 991.3 12. Juli 2000 (12.07.2000) DE

Veröffentlicht:

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): QIAGEN GMBH [DE/DE]; Max-Volmer-Strasse 4,
40724 Hilden (DE).

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

Zur Erklärung der Zwei-Buchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): WEBER, Martin
[DE/DE]; Fliederweg 26, 42799 Leichlingen (DE).



(54) Title: METHOD FOR ISOLATING NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

(57) Abstract: The invention relates to a method for isolating nucleic acids from a solution, wherein the nucleic acids are adsorbed on a surface containing SiO₂ in the presence of alkali halides and alcohol. The invention also relates to the use of a buffer solution containing alkali halides for isolating nucleic acids on a carrier containing SiO₂, in addition to a kit for implementing a method for isolating nucleic acids from a solution.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer Lösung, wobei die Nukleinsäuren an einer SiO₂-haltigen Oberfläche in Gegenwart von Alkalihalogeniden und Alkohol absorbiert werden. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung einer Pufferlösung enthaltend Alkalihalogenide zur Isolierung von Nukleinsäuren an einem SiO₂-haltigen Träger sowie ein Kit zur Durchführung eines Verfahrens zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer Lösung.

WO 02/04620 A2

Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer Lösung, wobei die Nukleinsäuren an einer SiO₂-haltigen Oberfläche adsorbiert werden.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung einer Pufferlösung zur Isolierung von Nukleinsäuren an einem SiO₂-haltigen
10 Träger sowie ein Kit zur Durchführung eines Verfahrens zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer Lösung.

Die Reinigung und Isolierung von Nukleinsäuren an mineralischen Trägern in Gegenwart von chaotropen Salzen ist in der Literatur
15 wohlbekannt.

Marko et al. [Analyt. Biochem. 121 (1982) 382] sowie Vogelstein et al. [Proc. Nat. Acad. Sci. 76 (1979) 615] erkannten, dass, falls die DNA aus Nukleinsäure-enthaltenden Extrakten hohen Konzentrationen von
20 Natriumjodid oder Natriumperchlorat ausgesetzt wird, nur die DNA an mechanisch fein zerkleinerten Glass-Scintillationsröhren sowie zerkleinerten Glasfasermembranen bzw. Glasfiberplatten bindet, während RNA und Proteine nicht binden. Die so gebundene DNA kann ggf. mit Wasser eluiert werden.

25 Die EP 0389063 B1 betrifft ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer biologischen Quelle. Gemäß dieser Methode werden die Nukleinsäuren enthaltenden biologischen Quellen, wie Blut, Zellen, Plasma etc. in Gegenwart von chaotropen Salzen in hohen
30 Konzentrationen aufgeschlossen und anschließend die Nukleinsäuren an

eine Silikaoberfläche gebunden. Diese werden dann gewaschen und eluiert.

- Das im US Patent 5,155,018 beschriebene Verfahren beschreibt die
5 Isolierung von RNA aus biologischen Quellen, die neben RNA auch DNA und andere Inhaltsstoffe enthalten.

Die biologische Probe wird angesäuert und mit einem chaotropen Agens, wie z.B. einem Guanidiniumsalz vermischt. Der Probe werden Silikatpartikel zugegeben und unter den gegebenen Bedingungen bindet
10 RNA an die Silikatpartikel. Anschließend wird auch hier die RNA von den Partikeln abgetrennt.

Colpan et al. offenbaren in der WO 95/01359 ein Verfahren zur Reinigung und Trennung von Nukleinsäuregemischen durch Adsorption der
15 Nukleinsäure aus einer alkoholhaltigen Lösung mit hoher Ionenstärke. Die Adsorptionslösung enthält neben Alkohol in einer Konzentration von 1 bis 50 Vol.% Salze in einer Konzentration von 1 bis 10 M, wobei die chaotropen Salze, wie z.B. Guanidiniumthiocyanat, Natriumperchlorat, oder Guanidiniumhydrochlorid bevorzugt werden.

20 Gegenstand der WO 95/21849 ist ein Verfahren zur Trennung von doppel- und/oder einzelsträngigen Nukleinsäuren aus Quellen, die diese Nukleinsäuren enthalten. Auch bei diesem Verfahren werden die Nukleinsäuren an mineralischen Trägern adsorbiert unter Bedingungen,
25 die eine Bindung der gewünschten Nukleinsäurespezies erlauben, während die unerwünschte Nukleinsäurespezies nicht an diesen mineralischen Träger bindet.

Um überwiegend einzelsträngige Nukleinsäure an einen mineralischen
30 Träger zu binden und somit von doppelsträngiger Nukleinsäure zu trennen, werden die Behandlungsbedingungen für die beide

Nukleinsäurespezies enthaltenden Proben mit einem wässrigen Gemisch von Salzen, insbesondere chaotropen Salzen, und Alkohol entsprechend eingestellt. Die nicht adsorbierte doppelsträngige Nukleinsäure kann daraufhin mit bekannten Verfahren weiter aufgereinigt oder isoliert
5 werden.

Nukleinsäuren, die für molekularbiologische Anwendungen, wie z.B. für die PCR, die Sequenzierung, und den Gentransfer, insbesondere die Transfektion oder Vakzinierung, verwendet werden, unterliegen sehr
10 hohen Anforderungen an Reinheit und Integrität. Die Verwendung von Nukleinsäuren in der Molekularen Diagnostik oder Molekularen Medizin setzt voraus, dass diese frei sein müssen von toxischen Substanzen, die beispielsweise zu pathogenen Effekten in den zu behandelnden Organismen führen können.

15

Den aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren ist gemein, dass für die Isolierung von Nukleinsäuren an Silikaoberflächen chaotrope Salze in hohen Konzentrationen eingesetzt werden. Chaotrope Substanzen, wie Guanidiniumhydrochlorid, Guanidiniumthiocyanat oder Natriumperchlorat
20 sind hoch toxische Substanzen. Es ist nicht auszuschließen, dass die in Gegenwart dieser Substanzen isolierten Nukleinsäuren damit kontaminiert werden und somit für den Gebrauch bei molekularbiologischen Anwendungen nicht oder nur bedingt verwendbar sind.

25 Der Umgang mit chaotropen Substanzen stellt außerdem für den Anwender ein hohes gesundheitliches Risiko dar, so dass die Handhabung dieser Substanzen unter gewissen Schutzmassnahmen erfolgen muss.

30 Das technische Problem, das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegt, besteht darin, ein verbessertes Verfahren bereitzustellen, das die aus

dem Stand der Technik bekannten Nachteile überwindet. Die in diesem Verfahren zur Bindung der Nukleinsäure verwendeten Substanzen sollten nicht toxisch sein. Das Verfahren soll dabei möglichst kostengünstig sein, indem beispielsweise preisgünstige Chemikalien verwendet werden, und

5 die isolierten Nukleinsäuren sollten quantitativ und qualitativ rein isoliert werden.

Überraschenderweise wird mit der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer Lösung zur Verfügung gestellt,

10 das diese Aufgabe löst. Die Erfindung besteht darin, dass in einem ersten Schritt die Bindung von Nukleinsäuren an SiO₂-haltigen Oberflächen in Gegenwart von Alkalihalogeniden in einer Konzentration von 0,1 - 3 M, vorzugsweise 0,25 – 1,5 M, und Alkohol in einer Konzentration von 37 - 70 Vol.% durchgeführt wird. Die an der SiO₂-haltigen Oberfläche adsorbierten

15 Nukleinsäuren werden dann ggf. mit einem alkoholhaltigen Waschpuffer gewaschen und die Nukleinsäure mit einer wässrigen Salzlösung oder mit Wasser eluiert.

Zur Bindung der Nukleinsäuren an die SiO₂-haltige Oberfläche werden

20 wässrige Adsorptionslösungen eingesetzt, die Alkalihalogenide wie NaCl, KCl und LiCl in einer Konzentration von 0,1 – 3 M, vorzugsweise 0,25 - 1,5 M, besonders bevorzugt 0,5 - 1,25 M und insbesondere 0,5 - 1,0 M enthalten. Alkalihalogenide sind nicht-toxische Substanzen und die Handhabung der Salzlösungen in der eingesetzten Konzentration ist

25 gesundheitlich unbedenklich.

Die wässrigen Adsorptionslösungen enthalten neben den erwähnten Salzen niedere aliphatische, verzweigte oder unverzweigte Alkohole mit einer Kettenlänge von 1 bis 5 Kohlenstoffatomen. Die in der Lösung vorhandenen

30 aliphatischen Alkohole sind bevorzugt Methanol, Ethanol, Propanol, Isopropanol und Butanol in einer Konzentration von 37 - 70 Vol%, bevorzugt

37 - 50 Vol.%. Unter den vorgenannten Alkoholen werden Ethanol und/oder Isopropanol in einer Konzentration von 37 - 70 Vol.% besonders bevorzugt.

SiO₂-haltige Oberflächen können beispielsweise poröse oder nicht-poröse

- 5 Siliziumoxide oder Metall-Siliziummischoxide, Silikagele, Materialien auf Basis von Gläsern, z.B. modifizierte oder nicht-modifizierte Glaspartikel oder Glasmehl, Quarz, Zeolithe oder Mischungen von einer oder mehreren der oben genannten Substanzen sein.

Unter einer Oberfläche wird im Sinne der vorliegenden Erfindung jede
10 mikroporöse Trennschicht verstanden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die SiO₂-haltige Oberfläche eine poröse Membran oder ein Filter aus Silikagel, Glas - oder Quarzfasern.

- 15 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst der Begriff Oberfläche im weiteren Sinne auch eine Schicht von Partikeln bzw. auch ein Granulat sowie auch Fasern, wie z. B. Silikagelvliese.

- 20 Zur Elution der gebundenen Nukleinsäure eignen sich erfindungsgemäß Wasser oder wässrige Salzlösungen als Elutionsmittel. Als Salzlösungen werden Pufferlösungen eingesetzt, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, wie beispielsweise Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-
25 piperazino]ethansulfonsäure (HEPES) in einer Konzentration von 0,001 bis 0,5 Mol/Liter, bevorzugt 0,01 bis 0,2 Mol/Liter, besonders bevorzugt 0,01 bis 0,05 molare Lösungen.

- 30 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens können die im Eluat befindlichen Nukleinsäuren vorzugsweise auf dem Wege der alkoholischen Fällung isoliert werden.

Die mit diesem Verfahren isolierten Nukleinsäuren sind frei von toxischen Substanzen und somit geeignet für die Verwendung in der Molekularbiologie.

- 5 Im folgenden soll die Bezeichnung "Nukleinsäure" in ihrem breitesten Sinn verstanden werden, also Ribonukleinsäuren (RNA) wie auch Desoxyribonukleinsäuren (DNA) in allen Längen und Konfigurationen, wie Doppelstrang, Einzelstrang, zirkulär und linear, verzweigt usw. umfassen und alle möglichen Unterarten, wie z.B. monomere Nukleotide, Oligomere,
- 10 Plasmide, Cosmide, virale und bakterielle DNA und RNA, sowie genomische und nichtgenomische DNA und RNA aus Tier- und Pflanzenzellen oder anderen Eukaryonten, mRNA in prozessierter und unprozessierter Form, tRNA, hn-RNA, rRNA, cDNA sowie alle anderen denkbaren Nukleinsäuren einschließen.

15

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt es, Nukleinsäuren jeglicher Herkunft aus Lösungen zu isolieren. Die Nukleinsäuren enthaltende Probe stammt beispielsweise aus tierischen oder pflanzlichen Geweben, Gewebe- oder Zellkulturen, Knochenmark, humanen und tierischen 20 Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Urin, Sperma, Zerebrospinalflüssigkeit, Sputum und Abstrichen, Pflanzen, Pflanzenteilen und -extrakten, z.B. Säften, Pilzen, prokaryontischen oder eukaryontischen Mikroorganismen wie Bakterien oder Hefen, fossilen oder mumifizierten Proben, Bodenproben, Klärschlamm, Abwässern und Lebensmitteln 25 (insbesondere prozessierten, d.h. technisch aufbereiteten Lebensmitteln). Auch Nukleinsäuren, die durch chemische Reaktionen entstanden sind, wie z.B. solche, die durch Polymerasekettenreaktion (PCR) erhalten wurden oder Plasmid-DNA, genomische DNA und RNA und/oder Nukleinsäuren, die aus Mikroorganismen stammen, lassen sich 30 erfindungsgemäß isolieren.

Besonders geeignet ist das erfindungsgemäße Verfahren, um Plasmid-DNA aus Bakterien, wie z.B. E.coli für die anschließende Klonierung, Transfektion oder Sequenzierung zu isolieren.

5 Die Lyse der Bakterien erfolgt dabei nach bekannten Lyseverfahren, wie z.B. der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) oder der Lyse durch Erhitzen nach Holmes und Quigley.

10 Die Zelldebris sowie die ausgefallenen Proteine und die genomische DNA werden aus dem viskosen Lysat mittels Zentrifugation oder Filtration entfernt und man erhält ein geklärtes Lysat, das die Plasmid-DNA enthält. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA kann beispielsweise mittels Ionenaustauscherchromatographie erfolgen und die so vorgereinigte Plasmid-DNA anschließend mit dem erfindungsmäßigen Verfahren isoliert 15 werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer Lösung, umfassend

20 a) eine Adsorptionslösung enthaltend 0,25 - 1,5 M NaCl, KCl oder eine Mischung davon und Ethanol oder Isopropanol in einer Konzentration von 37 - 70 Vol %; und
b) eine SiO₂-haltige Oberfläche.

25 Die SiO₂-haltige Oberfläche kann eine poröse Membran oder ein Filter aus Silikagel, Glas - oder Quarzfasern und in einer geeigneten Vorrichtung angeordnet sein. Vorzugsweise enthält der Kit zusätzlich Lösungen geeignet für die Lyse sowie, wie zuvor beschrieben, Wasch- und Elutionspuffer.

30 Die erfindungsgemäß isolierten Nukleinsäuren sind frei von nukleinsäureabbauenden Enzymen und haben eine derartig hohe Reinheit,

daß sie unmittelbar in verschiedensten Weisen weiterbehandelt und bearbeitet werden können.

Die erfindungsgemäß hergestellten Nukleinsäuren können für Klonierungen
5 verwendet werden und als Substrate für verschiedenste Enzyme dienen, wie beispielsweise DNA-Polymerasen, DNA-Restriktionsenzyme, DNA-Ligase und reverse Transkriptase.

Die durch das erfindungsgemäße Verfahren bereitgestellten Nukleinsäuren
10 eignen sich in besonders guter Weise zur Amplifikation, insbesondere für die PCR, Strand Displacement Amplifikation, Rolling Circle Verfahren, Ligase Chain Reaction (LCR) und ähnlicher Verfahren.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich weiterhin in besonders guter Weise zur Bereitstellung von Nukleinsäuren für die Verwendung in der
15 Diagnostik, insbesondere für ein Diagnoseverfahren, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die durch das erfindungsgemäße Verfahren gereinigte Nukleinsäure in einem Folgeschritt amplifiziert wird und anschließend und/oder gleichzeitig die so amplifizierte Nukleinsäure detektiert wird (z. B. Holland, P.M. et al., 1991. Proc. Natl. Acad. Sci. 88,
20 7276 - 7280. Livak, K.J. et al., 1995. PCR Methods Applic. 4, 357 - 362; Kievits, T. et al., 1991. J. Virol. Meth. 35, 273 - 286; Uyttendaele, M. et al., 1994. J. Appl. Bacteriol. 77, 694 - 701).

25

Beispiel 1:

Isolierung von Plasmid-DNA in Gegenwart von NaCl und Alkohol in verschiedenen Konzentrationen.

Es wurden je 390 µl der einzelnen Puffer (0,25 - 1,5 M NaCl; 50 mM Tris,
30 pH 8,5; 15 % (w/v) Isopropanol) mit 10 µg Plasmid-DNA (pCMVβ; Fa. Clontech # 6177-1) (c = 1 µg/µl) gemischt und mit verschiedenen Mengen

an Isopropanol versetzt, die einem Gesamtanteil von 28,9 - 49,8 Vol% Isopropanol in den jeweiligen Bindepuffern entspricht. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur (20-25°C) wurden die Ansätze in eine Silikamembran enthaltende Säule überführt und unter Vakuum (ca. 600 mbar; Verwendung der QIAvac 6S der Fa. QIAGEN GmbH) durch die Silicamembran geführt. Anschließend wurde mit 750 µl Puffer PE (10 mM Tris, pH 7,5; 80 % Ethanol) gewaschen und bis zur Trockene Luft durch die Membran gezogen. Eluiert wurde durch Zugabe von 100 µl Puffer EB (10 mM Tris, pH 8,5) und die Ausbeute photometrisch bei 260 nm bestimmt. Das Ergebnis ist aus Tabelle 1 ersichtlich.

Tabelle 1:

Isopropanol (gesamt)	C _{NaCl}						
		0,25 M	0,5M	0,75 M	1,0 M	1,25 M	1,5 M
28,9 Vol %	DNA	4,7 [µg]	5,8 [µg]	8,0 [µg]	7,3 [µg]	7,6 [µg]	-
	OD ₂₆₀	0,0934	0,1154	0,1593	0,1456	0,1522	
34,3 Vol %	DNA	8,2 [µg]	8,1 [µg]	7,4 [µg]	7,5 [µg]	7,0 [µg]	6,4 [µg]
	OD ₂₆₀	0,1644	0,1611	0,1484	0,1491	0,1390	0,1493
39,0 Vol %	DNA	6,2 [µg]	5,8 [µg]	8,0 [µg]	6,2 [µg]	7,3 [µg]	5,8 [µg]
	OD ₂₆₀	0,1245	0,1161	0,1603	0,1244	0,1452	0,1211
43,1 Vol %	DNA	7,2 [µg]	7,7 [µg]	6,2 [µg]	6,9 [µg]	7,4 [µg]	5,5 [µg]
	OD ₂₆₀	0,1444	0,1534	0,1231	0,1375	0,1469	0,1100
46,6 Vol %	DNA	5,7 [µg]	8,4 [µg]	7,3 [µg]	8,5 [µg]	7,9 [µg]	5,6 [µg]
	OD ₂₆₀	0,1129	0,1669	0,1454	0,1701	0,1585	0,1104
49,8 Vol %	DNA	6,5 [µg]	6,0 [µg]	6,1 [µg]	6,3 [µg]	6,3 [µg]	3,3 [µg]
	OD ₂₆₀	0,1294	0,1200	0,1221	0,1252	0,1258	0,0719

Verdünnungsfaktor 20; Gesamtvolumen 50 µl; Ausbeute DNA 10 µg = 100%

Beispiel 2:

Isolierung von Plasmid-DNA bei verschiedenen Alkoholkonzentrationen

- 5 Es wurden 500 µg ($c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) Plasmid-DNA (pCMVβ; Fa. Clontech # 6177-1) in 5 ml Puffer Q1 (1,25 M NaCl; 50 mM Tris, pH 8,5; 15 Vol % Isopropanol) gelöst. Dann wurde Isopropanol zugegeben, in einer Menge, die einem Gesamtanteil von 22,7 - 43,3 Vol% Isopropanol im Bindepuffer entspricht, sorgfältig gemischt und 5 min bei Zimmertemperatur (20-25°C)
- 10 inkubiert. Das DNA/Q1/Isopropanol-Gemisch wurde in ein Glasfaserfilter gedrückt (Fa. Sartorius, Minisart-Serie) und die Membranen bis zur Trockne ausgeblasen. Die Elution erfolgte mit 1 ml TE-Puffer (10 mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA). Die Ausbeute wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

15

Tabelle 2:

Isopropanol (gesamt)	DNA [µg]	DNA [%]	OD ₂₆₀ Werte
22,7 Vol %	242	48	0,2419
29,2 Vol %	416	83	0,4159
34,6 Vol %	383	77	0,3826
39,3 Vol %	415	83	0,4146
43,3 Vol %	412	82	0,4118

Verdünnungsfaktor: 20; Gesamtvolumen: 1 ml

Beispiel 3:

Isolierung von Plasmid-DNA in Gegenwart von KCl und Alkohol in verschiedenen Konzentrationen

- 5 Es wurden je 390 µl der einzelnen Puffer (0,25 - 1,0 M KCl; 50 mM Tris, pH 8,5; 15 % (w/v) Isopropanol) mit 10 µg Plasmid-DNA (pCMVβ; Fa. Clontech # 6177-1) ($c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) gemischt und mit verschiedenen Mengen an Isopropanol versetzt, die einem Anteil von bis zu 57,3 Vol% Isopropanol (siehe Tabelle 3) bzw. bis zu 71,4 Vol-% Isopronal nebst
10 Ethanol in den jeweiligen Bindepuffern entsprachen. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur (20 -25°C) wurden die Ansätze in eine Silikamembran enthaltende Säule (QIAquick, Fa. QIAGEN GmbH, #28104) überführt und unter Vakuum (ca. 600 mbar; Verwendung der QIAvac 6S der Fa. QIAGEN GmbH) durch die Silicamembran geführt.
15 Anschließend wurde mit 750 µl Puffer PE (10 mM Tris, pH 7,5; 80 % Ethanol) gewaschen und bis zur Trockene Luft durch die Membran gezogen. Eluiert wurde durch Zugabe von 100 µl Puffer EB (10 mM Tris, pH 8,5) und die Ausbeute photometrisch bei 260 nm bestimmt.

20

Tabelle 3:

C _{KCl}	Isopropanol (gesamt)	Ausbeute DNA		Ethanol/ Isopropanol	Ausbeute DNA	
		[µg]	OD ₂₆₀		[µg]	OD ₂₆₀
0,25 M	46,6 Vol %	9,5	0,1185	66,7/5,9 Vol%	9,7	0,1208
0,5 M	49,8 Vol %	8,8	0,1101	71,4/4,2 Vol%	10,0	0,1355
0,75 M	46,6 Vol %	8,8	0,1098	60,0/5,9 Vol%	10,0	0,1322
0,75 M	57,3 Vol %	9,6	0,1194	66,7/4,2 Vol%	10,0	0,1770
1,0 M	43,1 Vol %	10,0	0,1727	33,3/9,8 Vol%	10,0	0,1280

Verdünnungsfaktor 20; Gesamtvolumen 80 µl.

Beispiel 4:

Isolierung von Plasmid-DNA in Gegenwart von LiCl; NaCl oder KCl und Alkohol in verschiedenen Konzentrationen

- 5 Es wurden je 390 µl der einzelnen Puffer (0,25 - 1,0 M Salz; 50 mM Tris, pH 8,5; 15 % (w/v) Isopropanol) mit 10 µl (\leq 10 µg) Plasmid-DNA (pCMV β ; Fa. Clontech # 6177-1) ($c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) gemischt und mit verschiedenen Mengen an Ethanol versetzt, die einem Anteil von bis zu 71,4 Vol% Ethanol (siehe Tabelle 4 unten) in den jeweiligen Bindepuffern entsprachen. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze in eine Silikamembran enthaltende Säule überführt und unter Vakuum (ca. 600 mbar; Verwendung der QIAvac 6S der Fa. QIAGEN GmbH) durch die Silikamembran geführt. Anschließend wurde mit 750 µl Puffer PE (10 mM Tris, pH 7,5; 80 % Ethanol) gewaschen und bis zur Trockene Luft durch die Membran gezogen. Eluiert wurde durch Zugabe von 100 µl Puffer EB (10 mM Tris, pH 8,5) und die Ausbeute photometrisch bei 260 nm bestimmt.
- 10
- 15

Tabelle 4:

[Salz] / [EtOH]	LiCl		NaCl		KCl	
	DNA [µg]	OD ₂₆₀	DNA [µg]	OD ₂₆₀	DNA [µg]	OD ₂₆₀
0,25M / 66,7Vol%	7,2	0,0721	7,6	0,0763	10,0	0,1087
0,5 M / 71,4 Vol %	7,9	0,0794	7,8	0,0783	10,0	0,1005
0,75M / 60 Vol %	9,0	0,0895	8,6	0,0862	8,8	0,0875
0,75M / 66,7Vol %	9,0	0,0857	7,7	0,0771	10,0	0,1001
1,0M / 33,3 Vol %	9,6	0,0963	10,0	0,1253	8,9	0,0890

20 Verdünnungsfaktor 20; Gesamtvolumen 100 µl

Beispiel 5.**Isolierung von größeren Mengen DNA**

Es wurden ansteigende Mengen an Plasmid-DNA ($c = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; pCMVb; 5 Fa. Clontech # 6177-1) in 15 ml Puffer Q1 (1,25 M NaCl; 50 mM Tris, pH 8,5; 15 Vol % Isopropanol) gelöst. Dann wurde Isopropanol bis zu einer Endkonzentration von 49,8 Vol % zugegeben, sorgfältig gemischt und 5 min auf der Laborbank inkubiert.

Das DNA/Q1/Isopropanol-Gemisch wurde in eine 20 ml Spritze überführt, 10 die mit einem eine Silikamembran enthaltenden Spritzenvorsatzfilter (Fa. Sartorius, Minisart-Serie) bestückt war. Das Gemisch wurde unter gleichmäßigem Druck durch den Filter gedrückt, dieser abgenommen, und mit der Spritze noch mehrmals Luft durch die Membran geblasen, um die Alkoholreste zu entfernen. Zur Elution wurden anschließend 5 ml TE- 15 Puffer (10 mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA) mittels einer frischen 5 ml Spritze durch den Spritzenvorsatzfilter gedrückt. Die Ausbeute wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 5 zusammengefaßt.

20

Tabelle 5:

pCMVb [mg]	1,5	2,0	2,5	3,0
Ausbeute DNA [mg]	1,274	1,577	2,367	2,523
Ausbeute DNA [%]	85	79	95	84
OD ₂₆₀	0,2547	0,3153	0,4733	0,5046

Verdünnungsfaktor: 20; Gesamtvolumen: 5 ml

Ergebnis:

Die Wiederfindungsrate der DNA liegt auch bei höheren Mengen an 25 Plasmid-DNA zwischen 80 und 90 %.

Beispiel 6

Isolierung von Plasmid-DNA in Gegenwart verschiedener NaCl-Konzentrationen und Alkohol

5

Es wurden je 340 µl einer NaCl-Lösung (0 M; 0,1 M; 0,25 M; 0,5 M; 1 M; 2,5 M; 5 M; gesättigte Lösung; 50 mM Tris; pH 8,5) mit 10µl einer 1 µg/µl enthaltenden Plasmid-DNA-Lösung (pCMVβ; Fa. Clontech # 6177-1) gemischt. Zu jeder Probe wurden 350 µl Isopropanol gegeben, wodurch sich eine Konzentration von 50 Vol-% für jeden Ansatz ergab. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur (20 – 25° C) in eine Säule (QIAvac 6S; QIAGEN GmbH) überführt, in welcher eine Glasfaser/Silika-Membran (QIAprep 8-well strips; QIAGEN GmbH) angeordnet war. Die DNA-haltigen Lösungen wurden unter Vacuum (ca. 600 mbar) durch die Membran geführt und anschließend mit 200 µl EB-Puffer (10 mM Tris; pH 8,5) eluiert. Die jeweiligen Ausbeuten an DNA (in Prozent der eingesetzten Menge) bei den für jede Salzkonzentration vorgenommenen vierfachen Bestimmungen sowie der jeweilige Durchschnittswert sind in der nachfolgenden Tabelle 6 angegeben.

10

15

Tabelle 6

Ausbeuten [%]:

	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Durchschnitt	STABW
0 M	17	16	19	18	17,5	1,291
0,1 M	100	100	100	100	100,0	0,000
0,25 M	100	100	100	100	100,0	0,000
0,5 M	100	100	100	100	100,0	0,000
1 M	100	100	100	100	100,0	0,000
2,5 M	100	100	100	100	100,0	0,000
5 M	70	73	74	73	72,5	1,732
gesättigt	83	68	75	79	76,3	6,397

STABW: Standardabweichung, ausgehend von einer Stichprobe

Das Ergebnis dieses Versuchs deutet darauf hin, daß die Ausbeute bei der DNA-Gewinnung bei sehr hohen Salzkonzentrationen (5 M, gesättigt) abnimmt im Vergleich zu geringeren Salzkonzentrationen zwischen 0,1 und 2,5 M.

5

Beispiel 7

Isolierung von Plasmid-DNA in Gegenwart verschiedener Salze bzw.

verschiedener Alkoholkonzentrationen

Es wurden je 500 µg Plasmid-DNA in 5 ml TE-Puffer (10mM Tris-Cl; pH 8,0; 1 mM EDTA; QIAGEN GmbH) gelöst und Isopropanol zugegeben, bis die Endkonzentrationen an Alkohol in den einzelnen Ansätzen bei 41,2, 50, 66,7 und 75 Vol-% lag. Alle Bestimmungen für die DNA-Isolierung wurden mit einem QIAprecipitator Maxi (QIAGEN GmbH) in einer QIAvec 6S-Säule (QIAGEN GmbH) durchgeführt. In Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Versuche zusammengefaßt, bei denen die Salzkonzentration in den jeweiligen Ansätzen 1,25 M NaCl betrug. Die Untersuchungen wurden jeweils mehrfach durchgeführt, wobei in Tabelle 7 die Ergebnisse für die einzelnen Proben und der daraus errechnete Mittelwert mit Standardabweichung angegeben sind.

Tabelle 7

Ausbeuten [%]

Vol % Isopropanol	41,2	50	66,7	75
1	81,1	100	60,6	37,3
2	93,1	93,2	69,9	42,9
3	67,7	77,2	86,4	75,5
4	55,2	70,5	88,4	67,1
5		71,8	68	63
6		51,4	65	60,6
Mittelwerte [%]	74,3	77,4	73,1	57,7
STABW	16,412	15,892	10,560	13,397

Anschließend wurden die vorstehend beschriebenen Versuche dahingehend abgeändert, daß die Art der verwendeten Salzlösung geändert wurde, und zwar wurde die 1,25 M NaCl-Lösung durch eine 1,25 M KCl-Lösung ersetzt. Die Ergebnisse der Versuche mit KCl-Lösung sind
 5 in Tabelle 8 wiedergegeben.

Tabelle 8

Ausbeuten [%]

Vol % Isopropanol	41,2	50	66,7	75
1	70,9	82,9	76,4	27
2	69	79,8	66,8	37
3	66,1	75,1	79,0	84,7
4	68,9	72,6	76,7	65,4
5		68,8	63,8	44,8
6		70,6	67,6	55,2
Mittelwerte [%]	68,7	75,0	71,7	52,4
STABW	1,977	4,984	5,817	18,975

- Schließlich wurde auch noch der Einfluß des verwendeten Puffers auf die
 10 Ausbeute bei der Plasmid-DNA untersucht. Dazu wurde wie vorstehend beschrieben vorgegangen, und in dem Ansatz mit einer 1,25 M NaCl-Lösung der TE-Puffer durch einen QF-Puffer (50 mM MOPS; pH 7,0; 15 % Isopropanol) ersetzt. Die Ergebnisse der Mehrfachbestimmungen nebst Mittelwert und Standardabweichung sind in Tabelle 9 zusammengefaßt.
 15 Die gegenüber den Tabellen 7 und 8 abweichenden Alkoholkonzentrationen in den einzelnen Ansätzen gehen auf den 15%-igen Isopropanolgehalt des QF-Puffers zurück.

Tabelle 9

Ausbeuten [%]

Vol % Isopropanol	22,7	50	57,5	78,8
1	59,6	79,8	71,7	39,2
2	40,7	78	82,2	39
3	24,4	91,8	76,8	69,1
4	25,6	57	79,8	67,8
5			72,2	68,4
6			49,2	55,6
Mittelwerte [%]	37,6	76,7	72,0	56,5
STABW	16,450	14,461	10,862	13,130

Die Ergebnisse zeigen, daß die Art des verwendeten Salzes (NaCl / KCl)

- 5 nur einen geringen Einfluß auf die Ausbeute bei der DNA-Isolierung zeigt.
Auch der Austausch des Puffers hat praktisch keinen Einfluß auf die DNA-Ausbeute (77,4 % bei 1,25 M NaCl und TE-Puffer und 75,0 % bei 1,25 M NaCl und QF-Puffer).

Patentansprüche

5 1. Verfahren zur Isolierung von Nukleinsäuren aus einer Lösung, mit den
folgenden Schritten:

- a) Adsorbieren der in der Lösung enthaltenen Nukleinsäuren in
Gegenwart von Alkali- und/oder Erdalkalisalzen an einer
10 SiO₂-haltigen Oberfläche,
- b) gegebenenfalls Waschen der an der SiO₂-haltigen Oberfläche
adsorbierten Nukleinsäuren mit einem alkoholhaltigen Waschpuffer,
und
- 15 c) Eluieren der Nukleinsäuren mit einer wäßrigen Lösung und
gegebenenfalls Isolieren der Nukleinsäuren,

dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt a) die Adsorption der
20 Nukleinsäuren an die SiO₂-haltige Oberfläche in Gegenwart von 0,1 bis
3 M Alkali- und/oder Erdalkalisalzen und 37 bis 70 Vol-% eines
aliphatischen Alkohols erfolgt.

25 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die
Nukleinsäure Plasmid-DNA ist.

30 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch
gekennzeichnet, dass die SiO₂-haltige Oberfläche aus Silikagel,
Glasfasern oder Quarzfaser besteht.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet,
dass die SiO₂-haltige Oberfläche eine Membran oder ein Filter ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet,
dass die in der Lösung enthaltenen Alkalosalze Halogenide,
vorzugsweise NaCl und/oder KCl sind.
- 10 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet,
dass in Schritt a) NaCl in einer Konzentration von 0,25 bis 1,5 M,
bevorzugt von 0,5 bis 1,25 M und besonders bevorzugt von 0,5 bis 1,0
M in der Lösung vorliegt.
- 15 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet,
dass die in der Lösung enthaltenen Alkohole niederaliphatische,
verzweigte oder unverzweigte Alkohole mit einer Kettenlänge von 1 bis
5 Kohlenstoffatomen sind.
- 20 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der in der
Lösung enthaltene Alkohol Ethanol oder/und Isopropanol ist.
- 25 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet,
dass die in Schritt c) verwendeten Elutionslösungen
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), Tris(hydroxymethyl)amino-
methan (TRIS) oder 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]ethansulfon-
säure (HEPES) in einer Konzentration von 0,001 bis 0,5 Mol/Liter,
bevorzugt 0,001 bis 0,2 Mol/Liter, besonders bevorzugt 0,01 bis 0,05
Mol/Liter enthalten.
- 30 10. Verwendung einer Lösung enthaltend 0,25 - 1,5 M NaCl, KCl oder
eine Mischung davon und Ethanol oder Isopropanol in einer

Konzentration von 37 - 70 Vol.-% zur Adsorption von Nukleinsäure an eine SiO₂-haltige Oberfläche.

11. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis
5, enthaltend

- a) eine Lösung nach Anspruch 10 und
- b) eine SiO₂-haltige Oberfläche.